

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/03180 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Februar 1993 (18.02.93)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01756 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 1992 (03.08.92) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;"> P 41 25 745.6 P 42 14 112.5 </div> <div style="text-align: left;"> 2. August 1991 (02.08.91) 29. April 1992 (29.04.92) </div> <div style="text-align: left;"> DE DE </div> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EURO- PÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstraße 1, D- 6900 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; Heidelbergerstraße 49, D-6901 Gailberg (DE). VOSS, Hartmut [DE/DE]; Hauptstraße 134 b, D-6901 Gailberg (DE). </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstraße 9, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse-</i> <i>nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-</i> <i>gen eintreffen.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01756 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 1992 (03.08.92) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;"> P 41 25 745.6 P 42 14 112.5 </div> <div style="text-align: left;"> 2. August 1991 (02.08.91) 29. April 1992 (29.04.92) </div> <div style="text-align: left;"> DE DE </div> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EURO- PÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstraße 1, D- 6900 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; Heidelbergerstraße 49, D-6901 Gailberg (DE). VOSS, Hartmut [DE/DE]; Hauptstraße 134 b, D-6901 Gailberg (DE).	(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstraße 9, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse-</i> <i>nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-</i> <i>gen eintreffen.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01756 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. August 1992 (03.08.92) (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: left;"> P 41 25 745.6 P 42 14 112.5 </div> <div style="text-align: left;"> 2. August 1991 (02.08.91) 29. April 1992 (29.04.92) </div> <div style="text-align: left;"> DE DE </div> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EURO- PÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstraße 1, D- 6900 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; Heidelbergerstraße 49, D-6901 Gailberg (DE). VOSS, Hartmut [DE/DE]; Hauptstraße 134 b, D-6901 Gailberg (DE).	(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw. ; Kopernikusstraße 9, D-8000 München 80 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelasse-</i> <i>nen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-</i> <i>gen eintreffen.</i>			
(54) Title: NEW PROCESS FOR SEQUENCING NUCLEIC ACIDS (54) Bezeichnung: NEUES VERFAHREN ZUR SEQUENZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN (57) Abstract <p>In order to sequence nucleic acids, a mixture of labelled nucleic acid fragments of various lengths is produced. The nucleic acid fragments used are labelled by insertion of at least one desoxyribonucleoside triphosphate with a non-radioactive labelling group, the labelled nucleic acid fragments are screened according to size and the nucleic acid sequence is determined from the labelling of the individual fragments.</p> (57) Zusammenfassung <p>Zur Sequenzierung von Nukleinsäuren erzeugt man ein Gemisch von markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge, wobei man Nukleinsäurefragmente verwendet, die durch Einbau von mindestens einem Deoxyribonukleosidtriphosphat mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe markiert sind, trennt die markierten Nukleinsäurefragmente nach Größe auf und bestimmt die Nukleinsäuresequenz über die Markierung der einzelnen Fragmente.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei		

Neues Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren

B e s c h r e i b u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur nicht-radioaktiven Sequenzierung von Nukleinsäuren.

Allgemein sind für die DNA-Sequenzierung zwei Methoden bekannt, nämlich das chemische Abbauverfahren nach Maxam und Gilbert (A.M. Maxam und W. Gilbert, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74 (1977), 560 und A.M. Maxam und W. Gilbert, Methods in Enzymol. 65 (1980), 499) und die enzymatische Kettenabbruchmethode (F. Sanger et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Bei der Maxam-Gilbert-Methode werden markierte DNA-Moleküle chemisch in basenspezifischer Weise modifiziert, ein partieller Strangabbruch bewirkt und die so erhaltenen Fragmente nach Größe aufgetrennt und die Sequenz anhand der Markierung bestimmt.

Bei der Methode nach Sanger werden, ausgehend von einer DNA-Matrize, viele verschieden lange markierte Nukleinsäurefragmente durch enzymatische Elongation bzw. Extension eines synthetischen Oligonukleotidprimers mit Hilfe von Polymerase und einer Mischung von Deoxyribonukleosidtriphosphaten und Kettenabbruchmolekülen, insbesondere Dideoxyribonukleosidtriphosphaten hergestellt. Hierbei wird üblicherweise jeweils in vier Ansätzen eine Mischung eines bestimmten Deoxyribonukleosidtriphosphats (dNTP) und eines entsprechenden Dideoxyribonukleosidtriphosphats (ddNTP) zusammen mit den drei anderen Deoxyribonukleosidtriphosphaten eingesetzt. Auf diese Weise wird ein statistischer Einbau der Kettenabbruchmoleküle in die wachsenden Nukleinsäureketten erreicht, wobei nach dem Einbau eines Kettenabbruchmoleküls die DNA-Kette aufgrund des Fehlens einer freien 3'-OH-Gruppe nicht mehr weiter wachsen kann. Es entsteht daher eine Vielzahl von unterschiedlich

langen DNA-Fragmenten, die statistisch gesehen, mindestens an jeder möglichen Einbaustelle ein Kettenabbruchmolekül enthalten und dort enden. Diese vier Ansätze mit den jeweils aufgrund des Einbaus von Kettenabbruchmolekülen spezifisch an einer Base endenden Fragmenten werden nach ihrer Länge, z.B. durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese, üblicherweise in vier verschiedenen Spuren aufgetrennt und die Sequenz anhand einer Markierung dieser Nukleinsäurefragmente ermittelt.

Bis etwa 1986 wurde die DNA-Sequenzierung unter Verwendung von radioaktiven (^{32}P - oder ^{35}S)-Markierungen durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente und Autoradiographie die Nukleotidsequenz erfolgte entweder manuell oder halbautomatisch. Heute wird die DNA-Sequenzierung mit automatisierten Systemen durchgeführt, bei denen eine nicht-radioaktive Markierung, insbesondere eine Fluoreszenzmarkierung verwendet wird (L.M. Smith et al., Nature 321 (1986), 674-679; W. Ansorge et al., J.Biochem. Biophys.Meth. 13 (1986), 315-323). Bei diesen automatisierten Systemen wird die Nukleotidsequenz direkt während der Auftrennung der markierten Fragmente gelesen und direkt in einen Computer eingegeben.

Gegenwärtig stehen zwei verschiedene nicht-radioaktive Markierungssysteme für die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode zur Verfügung. Eine Möglichkeit der Markierung von Nukleinsäurefragmenten besteht darin, einen markierten Oligonukleotidprimer für die Extensionsreaktion einzusetzen, so daß die Nukleinsäurekette an ihrem 5'-Ende eine Markierung trägt. Die andere Möglichkeit besteht darin, markierte Terminatoren, d.h. Kettenabbruchmoleküle zu verwenden, so daß die Nukleinsäurekette an ihrem 3'-Ende eine Markierung trägt. Eine Arbeit von Prober et al. (Science 238 (1987), 336-341) beschreibt ein Sequenzierungsverfahren, bei dem die vier Ketten-termini werden ddNTPs jeweils mit unterschiedlich n

Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, so daß alle vier Sequenzierungsansätze auf einer einzigen Gelspur aufgetrennt werden können. Ein ähnliches System mit 4 unterschiedlich markierten Primern ist in der GB-A 2155176 offenbart.

Bei beiden oben genannten Methoden wird aber nur eine einzige Markierung in die zu bestimmende Nukleinsäurekette eingeführt, was oft zu Sensitivitätsproblemen führen kann. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von farbstoffmarkierten Oligonukleotidprimern, insbesondere bei einer "Walking Primer"-Strategie ist, daß für jede Sequenzierungsreaktion unterschiedliche Primer verwendet werden müssen, wobei die Herstellung von markierten Primern aber sehr kostspielig oder/und aufwendig ist. Überdies wird durch die Verwendung markierter Primer manchmal die Hybridisierung des Primers mit der Nukleinsäurematrize behindert, was zu ungenauen Sequenzierungsergebnissen führen kann.

Auch die Verwendung von farbstoffmarkierten Terminatoren, insbesondere Dideoxyribonukleosidtriphosphaten, hat sich als nicht befriedigend erwiesen. Diese markierten Terminatoren werden von der Polymerase nur schlecht als Substrate akzeptiert, so daß sie dem Reaktionsansatz in großer Konzentration (millimolarer Bereich) und in hochgereinigter Form (quantitative Abtrennung von unmarkierten Molekülen) zugesetzt werden müssen. Dies führt dazu, daß die Verwendung von markierten Terminatoren sehr kostspielig ist. Überdies werden schlechtere Ergebnisse als z.B. bei Verwendung von markierten Primern erhalten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren bereitzustellen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise beseitigt sind.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren durch

- (a) Erzeugung eines Gemisches von markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge,
 - (b) Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente nach Größe und
 - (c) Bestimmung der Nukleinsäuresequenz über die Markierung der einzelnen Fragmente,
- welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man Nukleinsäurefragmente bestimmt, die durch Einbau von Deoxyribonukleosidtriphosphaten mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe markiert sind.

Die Sequenzierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann sowohl durch die chemische Abbaumethode nach Maxam und Gilbert als auch durch die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger erfolgen. In beiden Fällen erhält man ein Gemisch von nicht-radioaktiv markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge, die als "innere" Markierung mindestens ein Deoxyribonukleosidtriphosphat enthalten, das mit einer radioaktiven Markierungsgruppe versehen ist. Allgemein ist festzustellen, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren auf einfache Weise bei allen bekannten DNA-Sequenzierungsprotokollen (z.B. auch bei Festphasen-Sequenzierungen) anwenden läßt.

Als nicht-radioaktive Markierungsgruppen sind beispielsweise Metalle, magnetische Markierungsgruppen, die durch Kernresonanz oder durch einen supraleitenden quanten-interferometrischen Detektor (SQUID) nachweisbar sind, Phosphoreszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe geeignet. Besonders bevorzugt sind Fluoreszenzfarbstoffe, beispielsweise Rhodamin, Texasrot, Phycoerythrin oder Fluorescein und seine Derivate. Insbesondere sind solche Fluoreszenzfarbstoffe bevorzugt, die eine Absorption in einem Bereich von 600 bis 800 nm zeigen. Beispiele für eine Vielzahl geeigneter Farbstoffe sind im Katalog der Firma Molecular Probes zu finden.

Bei den markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten ist die Markierung vorzugsweise über einen Linker an die C₅-Position von Pyrimidinbasen (Uracil, Thymin oder Cytosin) oder an die N₇ oder C₈-Position von Purinbasen (Adenin, Guanosin, Hypoxanthin) oder an die C₇-Position von Purinbasen (7-Deazaguanidin) gekoppelt. Die Anzahl der Atome in der Kette des Linkers ist im allgemeinen 1 bis 50, vorzugsweise 4 bis 24 und besonders bevorzugt 10 bis 18.

Die Verwendung von markierten dNTPs wurde bereits in der DE-OS 38 41 565 als wünschenswert vorgeschlagen. Zu diesem Zeitpunkt waren aber weder geeignete chemische Substanzen verfügbar, noch war bekannt, ob diese Substanzen sich bei der Sequenzierungsreaktion, insbesondere bei einer automatisierten Sequenzierungsreaktion als geeignete Substrate erweisen.

Überraschenderweise hat sich Fluorescein-markiertes dUTP (Fluorescein-12-2'-Deoxyuridin-5'-triphosphat bzw. Fluorescein-12-dUTP), das kommerziell von Boehringer Mannheim (Katalog Nr. 1373242) erhältlich ist, als besonders geeignet erwiesen. Fluorescein-12-dUTP kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren anstelle von dTTP oder zusammen mit dTTP verwendet werden. Weiterhin haben sich auch Fluorescein-12-2'-dCTP, Fluorescein-15-2'-dGTP und insbesondere Fluorescein-15-2'-dATP als hervorragend geeignete markierte dNTPs erwiesen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können pro Ansatz ein einziges markiertes dNTP oder auch mehrere markierte dNTPs nebeneinander eingesetzt werden. Durch gleichzeitige Verwendung mehrerer markierter dNTPs kann die Anzahl der markierten Nukleotide in einer Kette stark erhöht werden, was z.B. günstig ist, wenn das zu sequenzierende Ausgangsmaterial nur in sehr geringer Konzentration zur Verfügung steht.

Wird das erfindungsgemäße Verfahren nach der chemischen Abbaumethode von Maxam und Gilbert durchgeführt, so gibt es verschiedene Möglichkeiten die Markierung in die zu sequenzierende Nukleinsäure einzuführen.

Einerseits kann etwa die Markierung über enzymatische Extension eines Oligonukleotidprimers in Gegenwart einer Polymerase, der zu sequenzierenden Nukleinsäure als Matrize und aller vier Deoxyribonukleosidtriphosphate, von denen mindestens eines eine Markierungsgruppe enthält, eingeführt werden. Dabei entsteht durch Verlängerung des Primers ein zur sequenzierenden Nukleinsäure komplementärer Strang, der Markierungsgruppen trägt, und der anschließend auf übliche Weise, d.h. durch partielle basenspezifische Spaltung mittels chemischer Methoden und anschließende Auftrennung des resultierenden Fragmentgemisches sequenziert werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Methode zur Markierung der Nukleinsäuren ligiert man eine Oligonukleotidkassette, die mindestens ein markiertes Deoxyribonukleotid enthält, in Restriktionsfragmente der zu sequenzierenden Nukleinsäure mit 5'- oder 3'-überhängenden Enden ein.

In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zur Markierung der Nukleinsäuren werden Restriktionsfragmente der zu sequenzierenden Nukleinsäure, welche überhängende 5'-Enden aufweisen, mit Polymerase oder Reverser Transkriptase in Gegenwart von mindestens einem markierten Deoxyribonukleosidtriphosphat aufgefüllt.

Beispiele für weitere bevorzugte Ausführungsformen des Maxam-Gilbert-Verfahrens sind in der DE-OS 38 39 397 offenbart, auf deren Inhalt hier Bezug genommen wird.

Die erfindungsgemäße Sequenzierung erfolgt vorzugsweise durch die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger. Bevorzugt

ist ein Verfahren zur nicht-radioaktiven Sequenzierung von Nukleinsäuren durch

- (a) enzymatische Extension eines Oligonukleotidprimers in Gegenwart von Polymerase, Deoxyribonukleosidtriphosphaten, Kettenabbruchmolekülen und der zu sequenzierenden Nukleinsäure als Matrize in einem oder mehreren Ansätzen, wobei ein Gemisch von markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge gebildet werden,
- (b) Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente nach Größe und
- (c) Bestimmung der Nukleinsäuresequenz über die Markierung der einzelnen Fragmente,

welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Elongation des Oligonukleotidprimers in Gegenwart von mindestens einem Deoxyribonukleosidtriphosphat mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe durchführt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß nicht-radioaktiv markierte Deoxyribonukleosidtriphosphate, insbesondere mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Deoxyribonukleosidtriphosphate, bei einer Sequenzierungsreaktion in ausreichendem Umfang von der Polymerase als Substrat akzeptiert werden. Bei Einsatz von Fluorescein-12-dUTP, Fluorescein-12-dCTP, Fluorescein-15-dATP und Fluorescein-15-dGTP als nicht-radioaktiv markierte Deoxyribonukleosidtriphosphate und jeweils den anderen nicht markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät (A.L.F. DNA-Sequencer von Pharmacia-LKB) wurden hervorragende Resultate erhalten.

Im Gegensatz zu den Verfahren gemäß dem Stand der Technik können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren gleich mehrere markierte Nukleotide in ein einziges DNA-Fragment eingebaut werden, wodurch sich die Signalstärke und damit die Sensitivität der Bestimmung um ein Größenordnung oder mehr erhöhen.

Ferner ermöglicht die hohe Signalstärke einen sensitiven Nachweis von Fluoreszenzbanden in einem automatischen Sequenziergerät, sogar wenn sie sehr schnell durch den als Detektor verwendeten Laserstrahl wandern, so daß eine Durchführung von DNA-Sequenzierungsreaktionen, die mit sehr hoher Geschwindigkeit, bis zu mehreren Tausend Basen pro Stunde pro Klon arbeiten, durch Verwendung hoher Spannungen, z.B. in ultradünnen Plattengelen oder in ultradünnen Kapillaren ermöglicht wird.

Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist seine Einfachheit, da keine markierten Primer bzw. keine markierten Kettenabbruchmoleküle benötigt werden. Dies ist insbesondere für Sequenzierprojekte in großem Maßstab, wie die Sequenzierung des menschlichen Genoms oder anderer Genomprojekte bedeutsam. Bei Verwendung von markierten dNTPs bei der Sequenzierungsreaktion können Standardprimer verwendet werden, so daß eine zeit- oder/und kostenintensive Herstellung von markierten Oligonukleotidprimern vermieden werden kann. Andererseits können, sofern gewünscht, natürlich auch markierte Primer verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Auflösung der Sequenzleiter insbesondere bei größeren Länge überraschenderweise gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Verwendung von markierten Primern verbessert wird. Dies gilt insbesondere bei einer Verfahrensführung, wo die Markierung und die Extension in zwei getrennten Schritten erfolgen (siehe Beispiele 2 und 3) und bei Verwendung von Fluorescein-dATP oder Fluorescein-dUTP als Markierung.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß man einen Oligonukleotidprimer ohne Markierungsgruppe, insbesondere einen am 5'-Ende unmodifizierten Oligonukleotidprimer einsetzen kann. Andererseits ist es aber auch möglich, in

Kombination mit den markierten dNTPs einen Oligonukleotidprimer zu verwenden, der an seinem 5'-Ende mit einem Farbstoff oder/und einer zu einer Affinitätsbindung fähigen Gruppe modifiziert ist. So ist z.B. eine Doppelmarkierung möglich, d.h. man verwendet einen Farbstoff-markierten Oligonukleotidprimer, der eine andere Fluoreszenzwellenlänge als die bei dem entsprechenden Ansatz verwendeten markierten dNTPs aufweist. Ferner kann der Oligonukleotidprimer an seinem 5'-Ende biotinyliert sein, wodurch z.B. die Bindung an eine mit Streptavidin beschichtete Festphase möglich ist. Andere Beispiele für Gruppen, die zu einer Affinitätsbindung fähig sind, sind Haptene (z.B. Digoxigenin oder Digoxin), die mit einem für das entsprechende Hapten spezifischen Antikörper bindefähig sind.

Als Kettenabbruchmoleküle für das erfindungsgemäße Verfahren werden zweckmäßigerweise Deoxyribonukleosidtriphosphate verwendet, die an der 3'-Position der Deoxyribose so modifiziert sind, daß sie keine freie OH-Gruppe aufweisen, und aber dennoch von der Polymerase als Substrat akzeptiert werden. Beispiele für solche Kettenabbruchmoleküle sind etwa 3'-Fluor-, 3-O-Alkyl- oder 3'-H-modifizierte Deoxyribonukleotide. Vorzugsweise werden als Kettenabbruchmoleküle 3'-H-modifizierte Deoxyribonukleotide, d.h. Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Vorzugsweise arbeitet man bei dem erfindungsgemäßen Verfahren mit unmarkierten Kettenabbruchmolekülen, es ist jedoch auch möglich, markierte Kettenabbruchmoleküle, wie sie dem Fachmann bekannt sind, zu verwenden.

Erfindungsgemäß werden zur enzymatischen Extension eines Oligonukleotidprimers bzw. zur Auffüllung von Restriktionsfragmenten vorzugsweise das Klenow-Fragment der E.coli-DNA-Polymerase I, modifizierte oder unmodifizierte T7-DNA-Polymerase, T4-DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase, Bst-DNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase verwendet. Von diesen Polymerasen sind die T7-DNA-Polymerase und die thermostabilen

Taq- und Bst-DNA-Polymerasen besonders bevorzugt. Überraschenderweise werden die nicht-radioaktiv markierten dNTPs von diesen Enzymen bei einer Sequenzierungsreaktion als Substrate akzeptiert.

Die Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nach allen in der Technik bekannten Methoden, z.B. durch verschiedene elektrophoretische (z.B. Polyacrylamid-Gelelektrophorese) oder chromatographische (z.B. HPLC) Verfahren erfolgen, wobei eine gelelektrophoretische Auftrennung bevorzugt ist. Ferner kann die Auftrennung der markierten Nukleinsäuren auf an sich beliebige Weise, d.h. manuell, halbautomatisch oder automatisch erfolgen, wobei jedoch die Verwendung eines automatischen Sequenziergeräts im allgemeinen bevorzugt ist. In diesem Fall kann dann die Auftrennung der markierten Nukleinsäuren in ultradünnen Plattengelen von 20 bis 200 μm , vorzugsweise 100 μm Dicke (siehe z.B. Stegemann et al., Methods in Mol. and Cell.Biol. 2 (1991), 182-184) oder Kapillaren durchgeführt werden.

Bei Verwendung von Deoxyribonukleosidtriphosphaten, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Bestimmung der Markierung nach Auftrennung der einzelnen Nukleinsäurefragmente gemäß ihrer Größe dadurch erfolgen, daß man den Fluoreszenzfarbstoff durch Laser oder andere geeignete Lichtquellen (z.B. LEDs, Fluoreszenzlampen oder Diodenlase) anregt. Derartige Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden in kommerziell verwendeten Sequenziergeräten (z.B. A.L.F. Sequencer von Pharmacia) bereits eingesetzt.

Steht für eine Sequenzbestimmung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nur eine sehr geringe Menge der zu sequenzierenden Nukleinsäure zur Verfügung, so kann ein Amplifizierungsschritt durchgeführt werden. Eine Möglichkeit der Amplifizie-

nung besteht darin, einen oder mehrere Zyklen einer Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) unter Verwendung von zwei Primern vor der eigentlichen Sequenzierung durchzuführen. Die PCR erfolgt üblicherweise ohne markierte dNTPs. So kann die zu sequenzierende Nukleinsäure vor Durchführung der eigentlichen Sequenzierung amplifiziert werden.

Andererseits kann der Amplifizierungsschritt auch mit Hilfe einer "Thermocycling"-Reaktion erfolgen. Die Thermocycling-Reaktion entspricht einer "normalen" Sequenzierungsreaktion, die allerdings - wie eine PCR - in mehreren Zyklen durchgeführt wird. Der Reaktionsansatz enthält die Nukleinsäure-Matrize, den Primer, die dNTPs und jeweils entsprechende Kettenabbruchmoleküle sowie eine vorzugsweise thermostabile Polymerase. Auf diese Weise wird pro Zyklus immer eine bestimmte Menge der markierten Nukleinsäurefragmente synthetisiert, wobei in mehreren Zyklen große Mengen an markierten Fragmenten erzeugt werden können, so daß die DNA linear und nicht wie bei der PCR exponentiell amplifiziert wird.

Die zu sequenzierende Nukleinsäure kann sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger Form vorliegen. Es werden gute Ergebnisse erhalten, wenn sich die zu sequenzierende Nukleinsäure auf einem doppelsträngigen DNA-Vektor, z.B. einem Plasmid, Cosmid, Bakteriophagen (Lambda oder P1), einem viralen Vektor oder einem künstlichen Chromosom (künstliches Hefechromosom) befindet.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens führt man die enzymatische Elongationsreaktion auf übliche Weise, d.h. in mehreren getrennten Ansätzen durch, wobei man in jedem Ansatz unterschiedliche Kettenabbruchmoleküle, d.h. Terminatoren mit unterschiedlichen Nukleotidbasen, verwendet. Die Kettenabbruchmoleküle können entweder gleich zu Beginn der Reaktion zugesetzt werden oder die Reaktion kann in zwei Schritten, einem Extensionsschritt

in Abwesenheit von Kettenabbruchmolekülen und einem Terminationsschritt in Gegenwart des jeweiligen Kettenabbruchmoleküls durchgeführt werden. Verwendet man T7-DNA-Polymerase zur Kettenverlängerung, kann z.B. der Extensionsschritt (ohne ddNTPs) in Gegenwart von Magnesium- und der Terminationschritt (mit ddNTPs) in Gegenwart von Manganionen durchgeführt werden.

Gemäß dieser Ausführungsform werden vorzugsweise vier parallele Ansätze durchgeführt, wobei in jedem Ansatz ein anderes ddNTP als Kettenabbruchmolekül vorhanden ist. Werden in diesen vier Ansätzen jeweils gleiche Markierungen (ein oder mehrere markierte dNTPs) verwendet, ist eine getrennte Auftrennung der einzelnen Ansätze erforderlich. In einer bevorzugten Variante dieser Ausführungsform kann man zwei (oder mehrere) Sequenzierungsreaktionen mit unterschiedlich markierten dNTPs durchführen, wobei jeweils solche Markierungsgruppen verwendet werden, die nebeneinander nachweisbar sind. So kann man z.B. in einer ersten Reaktion (d.h. in allen 4 Ansätzen dieser Reaktion) Fluorescein-dNTP und in einer zweiten Reaktion Rhodamin-dNTP verwenden. Die Auswertung dieser beiden Reaktionen kann gemeinsam erfolgen, wobei man 2 Ansätze mit jeweils unterschiedlichen Markierungen (d.h. eine Fluorescein- und eine Rhodamin-Markierung) auf eine einzige Gelspur aufträgt und getrennt (durch Messung bei unterschiedlichen Fluoreszenzwellenlängen) bestimmt.

Setzt man andererseits bei einer Reaktion in verschiedenen Ansätzen jeweils unterschiedliche Markierungen ein (z.B. durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Absorptionswellenlängen), so können auch mehrere oder sogar alle Ansätze einer einzigen Reaktion gemeinsam, z.B. auf einer Gelspur, aufgetrennt werden.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß man in einem einzigen Ansatz

mindestens zwei verschiedene Kettenabbruchmoleküle in unterschiedlichen Mengen zusammen einsetzt, wobei in diesem Falle eine Unterscheidung der Fragmente über die Intensität ihres Markierungssignals getroffen werden kann. Derartige Verfahren sind beispielsweise Gegenstand der DE-OS 38 41 565.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von nicht-radioaktiv markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten bei Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren nach der Abbaumethode von Maxam und Gilbert oder nach der Kettenabbruchmethode von Sanger. Die Markierung ist dabei vorzugsweise ein Fluoreszenzfarbstoff, besonders bevorzugt Fluorescein oder ein Derivat davon. Die Markierung ist vorzugsweise über einen Linker mit dem dNTP verknüpft. Die Anzahl der Atome in der Kette des Linkers beträgt im allgemeinen 1 bis 50, vorzugsweise 4 bis 24 und besonders bevorzugt 8 bis 18. Als günstig für ein automatisches Sequenzierverfahren hat sich die Verwendung von Fluorescein-12-dUTP, Fluorescein-12-dCTP, Fluorescein-15-dGTP oder/und Fluorescein-15-dATP erwiesen.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, das mindestens ein Deoxyribonukleosidtriphosphat enthält, das mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe markiert ist. Das Reagenz kann z.B. in Form einer Lösung, einer Suspension oder eines Lyophilisats sein. Das Reagenz kann auch Bestandteil eines Reagenzienkits zur Sequenzierung von Nukleinsäuren sein, wobei dieser Kit zusätzliche Reagenzien (z.B. Enzym, Primer, Pufferlösungen, nicht markierte NTPs, Terminatoren) enthalten kann.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung in Verbindung mit den Figuren 1 bis 3 weiter verdeutlichen.

- Figur 1 zeigt das Ergebnis einer Plasmidsequenzierung mit Fluorescein-12-dUTP als Markierung.
- Figur 2 zeigt das Ergebnis einer Plasmidsequenzierung mit Fluorescein-12-dCTP als Markierung,
- Figur 3 zeigt das Ergebnis einer Plasmidsequenzierung mit Fluorescein-15-dATP als Markierung.

Beispiel 1

DNA-Sequenzierung mit einer Fluorescein-12-dUTP-Markierung

Die Sequenzierung wurde mit einem automatischen DNA-Sequenziergerät (A.L.F. DNA-Sequencer von Pharmacia LKB) durchgeführt. Es wurden Versuche mit T7-DNA-Polymerase und Mangan- bzw. Magnesiumpuffer unter Verwendung von einzelsträngigen und doppelsträngigen DNA-Matrizen durchgeführt. Die Nukleotide und Enzyme wurden von Pharmacia PL bezogen. Fluorescein-12-dUTP wurde von Boehringer Mannheim bezogen. Gute Ergebnisse wurden unter Verwendung des folgenden Reaktionsprotokolls erhalten:

1. Denaturierung und Annealing

5 µg Plasmid-DNA (hergestellt durch Reinigung über eine Qiagen-Säule) in 6 µl bidest H₂O wurden mit 2 µl Sequenzierprimer (1 µmol/l) vermischt, durch Zugabe von 1 µl 1M NaOH für 3 Minuten bei 70°C denaturiert und mit 1 µl 1M HCl neutralisiert. 2 µl frisch hergestellter 10X Reaktionspuffer (300 mmol/l Tris HCl, pH 7,5, 150 mmol/l DTT, 60 mmol/l MnCl₂, 460 mmol/l DL-Isocitrat) wurden zugegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

2. Extension und Markierung

Zu dem obigen Ansatz wurden 2 µl Markierungsmischung (jeweils 1,5 µmol/l dATP, dCTP, dGTP und Fluorescein-12-dUTP) wurden

zusammen mit 3,5 U T7-DNA-Polymerase gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Termination

4 μ l Aliquots des Reaktionsprodukts wurden zu 3 μ l der vier jeweiligen Terminationsmischungen (1 mmol/l dATP, 1 mmol/l dCTP, 1 mmol/l 7-Deaza-dGTP, 1 mmol/l dTTP, jeweils 5 μ mol/l ddNTP) gegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 4 μ l deionisiertem Formamid mit 5 mg/ml Dextranblau gestoppt, durch Erhitzen denaturiert und auf das Sequenzgel gegeben.

Figur 1 zeigt das Ergebnis einer typischen Plasmidsequenzierung unter Verwendung von Fluorescein-12-dUTP als Markierung. Das Signal beginnt direkt nach dem ersten markierten T-Rest nach der Primingstelle ohne sichtbaren Primerpeak. Die Intensitäten bei multiplen Peaks sind gleich wie in Primerexperimenten mit Endmarkierung. Sowohl Magnesium- als auch Manganpuffer für die T7-DNA-Polymerase haben sich als geeignet erwiesen.

Eine automatisierte DNA-Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten dNTPs weist gegenüber anderen Markierungstechniken verschiedene Vorteile auf.

1. Die Markierungsintensität ist eindeutig stärker als bei bekannten Protokollen. Dabei sind 200 ng ss-DNA zur Sequenzierung ausreichend. Bei bekannten Verfahren wird üblicherweise ca. 1 μ g ss-DNA eingesetzt.
2. Jeder beliebige unmarkierte Oligonukleotidprimer (z.B. Primer für Expressionsvektoren) kann direkt verwendet werden. Die "Walking Primer"-Methode wird erleichtert, da keine Markierung von Primern oder eine Reinigung des markierten Produkts erforderlich ist. Da keine Wechselwirkung mit einem Farbstoff am 5'-Ende des Primers auftreten kann, sind kürzere Oligonukleotid (12-15 Basen) zur Verwendung geeignet.

3. Im Vergleich zu Fluoreszenz-markierten ddNTPs ist der Preis der Markierung vernachlässigbar (weniger als 0,05 DM pro Reaktion). Überdies ist keine Entfernung von nicht eingebauter Markierung erforderlich.
4. Das Fluoreszenz-markierte dUTP wird von vielen DNA-Polymerasen (T4, T7, Klenow, Taq, Bst, AMV-Reverse Transkriptase) als Substrat akzeptiert.

Beispiel 2

Einzelsträngige DNA-Sequenzierung mit Fluorescein-dNTPs unter Verwendung des Pharmacia AutoRead Kits

1. Denaturierung und Annealing (in einem Gefäß)

10 µl einzelsträngige Template-DNA (200 ng M13), 2 µl unmarkierter Sequenzierprimer (5 µmol/l) und 2 µl Annealing-Puffer wurden vermischt, 3 Minuten lang auf 65°C erhitzt und auf 37°C abkühlen gelassen.

2. Markierung

Zu dem obigen Ansatz wurde 1 µl Markierungsmischung (10 µmol/l markiertes dNTP und jeweils 1 µmol/l der nicht markierten dNTPs) zusammen mit 0,5 µl T7-DNA-Polymerase (3,5 U) gegeben, vermischt und 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

3. Termination

Der obige Ansatz wurde mit 1 µl Extensionspuffer vermischt. Dann wurden 4 µl Aliquots davon zu 4 µl der jeweiligen A-, C-, G- und T-Mixe (3 µl der jeweiligen Terminationsmischung und 1 µl DMSO) gegeben und 5 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit jeweils 4 µl Stopplösung gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend durch Erhitzen denaturiert und auf das Sequenzgel gegeben.

Beispiel 3

Doppelsträngige DNA-Sequenzierung mit Fluorescein-dNTPs unter Verwendung des Pharmacia AutoRead Kits

1. Denaturierung und Annealing (in einem Gefäß)

10 µl Plasmid-DNA (1/3 einer Minipräparation über eine Quiagensäule), 2 µl nicht markierter Sequenzierprimer (5 µmol/l) und 1 µl 1 mol/l NaOH wurden vermischt, 3 Minuten lang bei 65°C erhitzt und bei 37°C inkubiert.

2. Markierung

Zu dem obigen Ansatz wurden 1 µl 1 mol/l HCl, 2 µl Annealing-Puffer, 1 µl Markierungsmischung (10 µmol/l markiertes dNTP und jeweils 1 µmol/l der nicht markierten dNTPs) zusammen mit 0,5 µl T7-DNA-Polymerase (3,5 U) gegeben und 10 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

3. Termination

Der obige Ansatz wurde mit 1 µl Extensionspuffer vermischt. 4 µl Aliquots davon wurden zu 4 µl der jeweiligen A-, C-, G- und T-Mixe (3 µl der jeweiligen Terminationsmischungen und 1 µl DMSO) gegeben und 5 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 4 µl Stopplösung gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz durch Erhitzen denaturiert und auf das Sequenzgel gegeben.

Die Figuren 2 und 3 zeigen die Ergebnisse einer Plasmidsequenzierung unter Verwendung des obigen Protokolls und Fluorescein-12-dCTP (Figur 2) bzw. Fluorescein-15-dATP (Figur 3) als Markierung.

Die Auswertung der Sequenzgele erfolgte auf dem automatischen EMBL Fluorescenc Sequencer. Bei Verwendung von Fluorescein-15-dATP als Markierung ist es möglich, bis zu 1000 Basen zu lesen.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren durch
 - (a) Erzeugung eines Gemisches von markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge,
 - (b) Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente nach Größe und
 - (c) Bestimmung der Nukleinsäuresequenz über die Markierung der einzelnen Fragmente,d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man Nukleinsäurefragmente bestimmt, die durch Einbau von mindestens einem Deoxyribonukleosidtriphosphat mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe markiert sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man das Gemisch von markierten Nukleinsäurefragmenten durch die chemische Abbaumethode erzeugt.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Markierung durch enzymatische Extension eines Oligonukleotidprimers in Gegenwart einer Polymerase, der zu sequenzierenden Nukleinsäure als Matrize und mindestens einem markierten Deoxyribonukleotid einführt und anschließend mittels chemischer Methoden eine partielle basenspezifische Spaltung der markierten Nukleinsäuren bewirkt.
4. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man die Markierung durch Ligation von Oligonukleotidkassetten, die markierte Deoxyribonukleotide enthalten, in Restriktionsfragmente d r z u s e q u e n z i e r e n d e n Nukleinsäure mit überhängenden 5'- oder 3'-Enden ein-

führt und anschließend mittels chemischer Methoden eine partielle basenspezifische Spaltung der markierten Nukleinsäuren bewirkt.

5. Verfahren nach Anspruch 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Markierung durch enzymatische Auffüllung von Restriktionsfragmenten der zu sequenzierenden Nukleinsäure mit überhängenden 5'-Enden in Gegenwart von mindestens einem markierten Deoxyribonukleotid einführt und anschließend mittels chemischer Methoden eine partielle basenspezifische Spaltung der markierten Nukleinsäuren bewirkt.
6. Verfahren nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man das Gemisch von markierten Nukleinsäurefragmenten durch die enzymatische Kettenabbruchmethode erzeugt.
7. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren nach Anspruch 6 durch
 - (a) enzymatische Extension eines Oligonukleotidprimers in Gegenwart von Polymerase, Deoxyribonukleosidtriphosphaten, Kettenabbruchmolekülen und der zu sequenzierenden Nukleinsäure als Matrize in einem oder mehreren Ansätzen, wobei ein Gemisch von markierten Nukleinsäurefragmenten mit unterschiedlicher Länge gebildet wird,
 - (b) Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente nach Größe und
 - (c) Bestimmung der Nukleinsäuresequenz über die Markierung der einzelnen Fragmente,d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Elongation des Oligonukleotidprimers in Gegenwart von mindestens einem Deoxyribonukleosidtriphosphat mit einer nicht-radioaktiven Markierungsgruppe durchführt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man Deoxyribonukleosidtriphosphate verwendet, die
über einen Linker mit der Markierungsgruppe verknüpft
sind.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Anzahl der Atome in der Kette des Linkers 10 bis
18 beträgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Deoxyribo-
nukleosidtriphosphate verwendet.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein oder Deri-
vate davon verwendet.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als markierte Deoxyribonukleotide Fluorescein-
12-dUTP, Fluorescein-12-dCTP, Fluorescein-15-dGTP
oder/und Fluorescein-15-dATP verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 3 oder 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man bei der enzymatischen Extension einen 5'-unmodi-
fizierten Oligonukleotidprimer verwendet.
14. Verfahren nach Anspruch 3 oder 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen Oligonukleotidprimer verwendet, der an
seinem 5'-Ende mit einem Farbstoff oder/und ein r zu
einer Affinitätsbindung fähigen Gruppe modifiziert ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man einen 5'-biotinylierten Oligonukleotidprimer
verwendet.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Kettenabbruchmoleküle 3'-modifizierte Deoxy-
ribonukleosidtriphosphate verwendet, die an der 3'-Posi-
tion des Zuckers eine F-, O-Alkyl- oder H-Gruppe aufwei-
sen.
17. Verfahren nach Anspruch 16,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Kettenabbruchmoleküle Dideoxyribonukleo-
sidtriphosphate verwendet.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 17,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man unmarkierte Kettenabbruchmoleküle verwendet.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 3, 5 oder 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man als Polymerase zur enzymatischen Extension oder
Auffüllung das Klenow-Fragment der E.coli DNA-Polymerase
I, modifizierte oder unmodifizierte T7-DNA-Polymerase,
T4-DNA-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase, Bst-DNA-Polyme-
rase oder Reverse Transkriptase verwendet.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Auftrennung der markierten Nukleinsäurefragmente
durch Gelelektrophorese erfolgt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Auftrennung der markierten Nukleinsäurefrag-
mente in einem automatischen Sequenziergerät durch-
führt.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die Auftrennung in ultradünnen Plattengelen oder
Kapillaren durchführt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man bei Verwendung von mit Fluoreszenzfarbstoffen
markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten nach Auftren-
nung der Nukleinsäurefragmente zur Bestimmung der Mar-
kierung den Fluoreszenzfarbstoff durch Laser anregt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man vor der Sequenzierungsreaktion zur Amplifizie-
rung der Menge der zu sequenzierenden Nukleinsäure einen
oder mehrere Zyklen einer PCR-Reaktion durchführt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 24,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Sequenzierungsreaktion zur Amplifizierung der
Menge der markierten Nukleinsäurefragmente in mehreren
Schritten als "Thermocycling"-Reaktion durchführt.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 25,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß sich die zu sequenzierende Nukleinsäure auf einem
doppelsträngigen DNA-Vektor befindet.

- 24 -

27. Verfahren nach Anspruch 26,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß der doppelsträngige DNA-Vektor ein Plasmid, Cosmid,
Bakteriophage, viraler Vektor oder ein künstliches Chromosom ist.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 27,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man die enzymatische Extension bei der Kettenabbruchmethode in mehreren getrennten Ansätzen durchführt, wobei man in jedem Ansatz ein unterschiedliches Kettenabbruchmolekül verwendet.
29. Verfahren nach Anspruch 28,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man in allen Ansätzen eine gleiche Markierung, bestehend aus einem oder mehreren markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten, verwendet, so daß eine getrennte Auftrennung der einzelnen Ansätze erforderlich ist.
30. Verfahren nach Anspruch 28,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man in verschiedenen Ansätzen jeweils unterschiedliche Markierungen verwendet, so daß eine gemeinsame Auftrennung dieser unterschiedlich markierten Ansätze möglich ist.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 27,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man mindestens zwei der Kettenabbruchmoleküle in unterschiedlichen Mengen zusammen in einem Ansatz einsetzt und die Unterscheidung der Fragmente über die Intensität ihres Markierungssignals trifft.
32. Verwendung von nicht-radioaktiv markierten Deoxyribonukleosidtriphosphaten bei einem Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung ein Fluoreszenzfarbstoff ist.
34. Verwendung nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung Fluorescein oder ein Derivat davon
ist.
35. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppe mit dem Deoxyribonukleosidtri-
phosphat über einen Linker verknüpft ist.
36. Verwendung nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Anzahl der Atome in der Kette des Linkers 10 bis
18 beträgt.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als markierte Deoxyribonukleosidtriphosphate
Fluorescein-12-dUTP, Fluorescein-12-dCTP, Fluorescein-
15-dATP oder/und Fluorescein-15-dGTP einsetzt.
38. Reagenz zur Sequenzierung von Nukleinsäuren,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens ein Deoxyribonukleosidtriphosphat
enthält, das mit einer nicht-radioaktiven Markierungs-
gruppe markiert ist.
39. Reagenz nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung ein Fluoreszenzfarbstoff ist.

40. Reagenz nach Anspruch 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung Fluorescein oder ein Derivat ist.
41. Reagenz nach Anspruch 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß es Fluorescein-n-dUTP, Fluorescein-n-dCTP, Fluorescein-n-dATP oder/und Fluorescein-n-dGTP enthält, wobei n von 10 bis 18 ist.
42. Reagenzienkit zur Sequenzierung von Nukleinsäuren,
dadurch gekennzeichnet,
daß er ein Reagenz nach einem der Ansprüche 38 bis 41 enthält.

Fig. 1

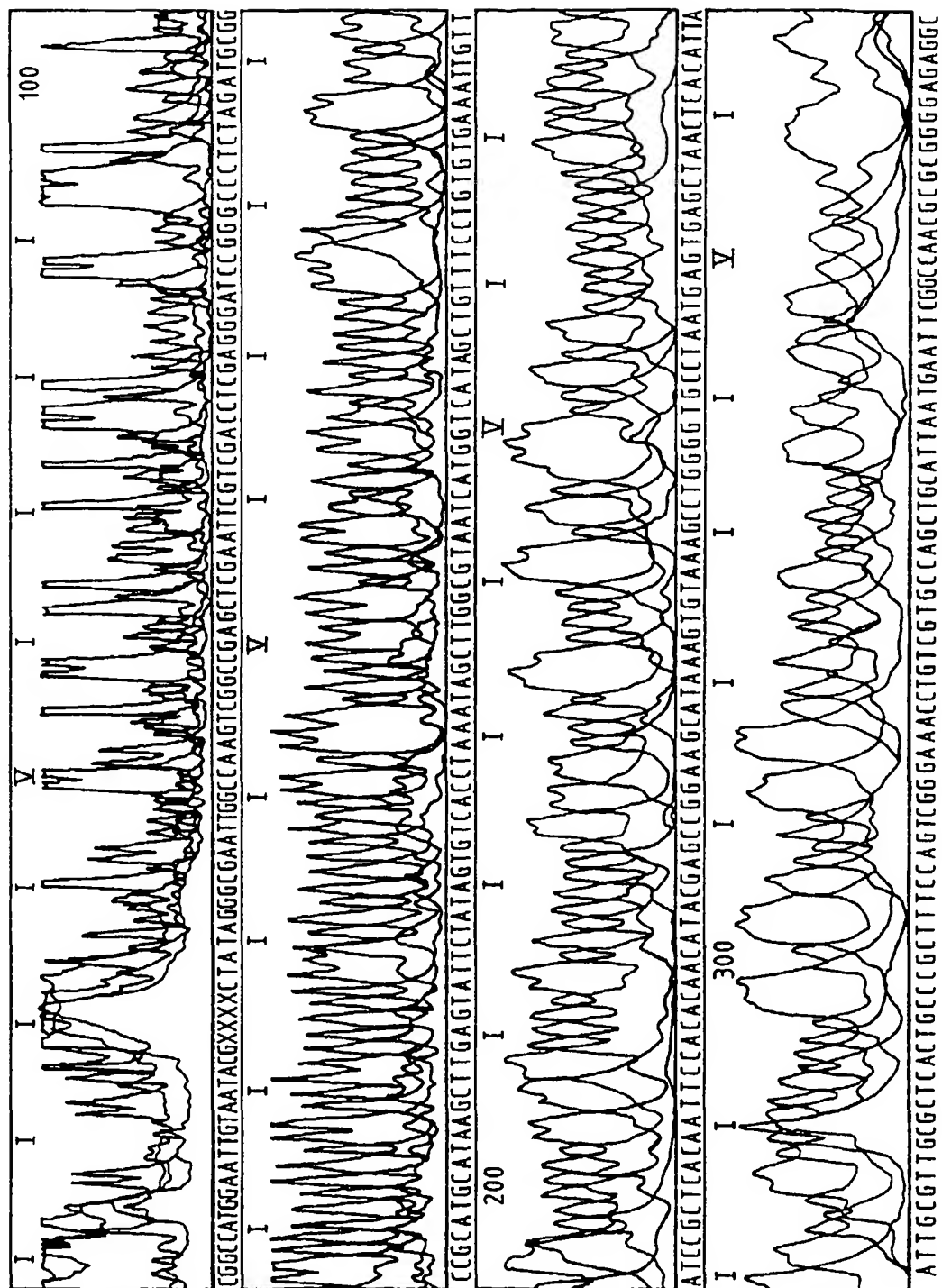
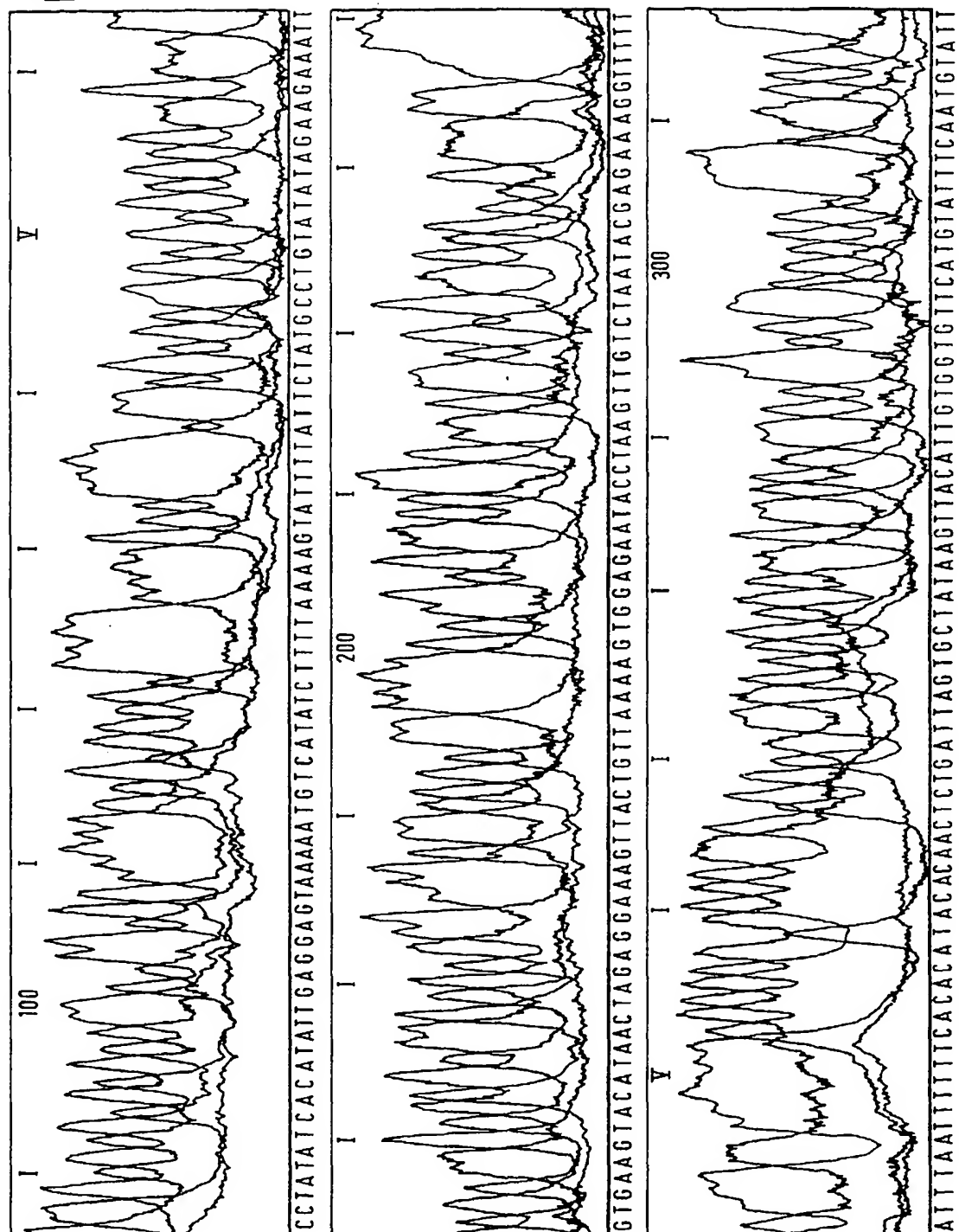


Fig. 2



3/5

Fig. 3a

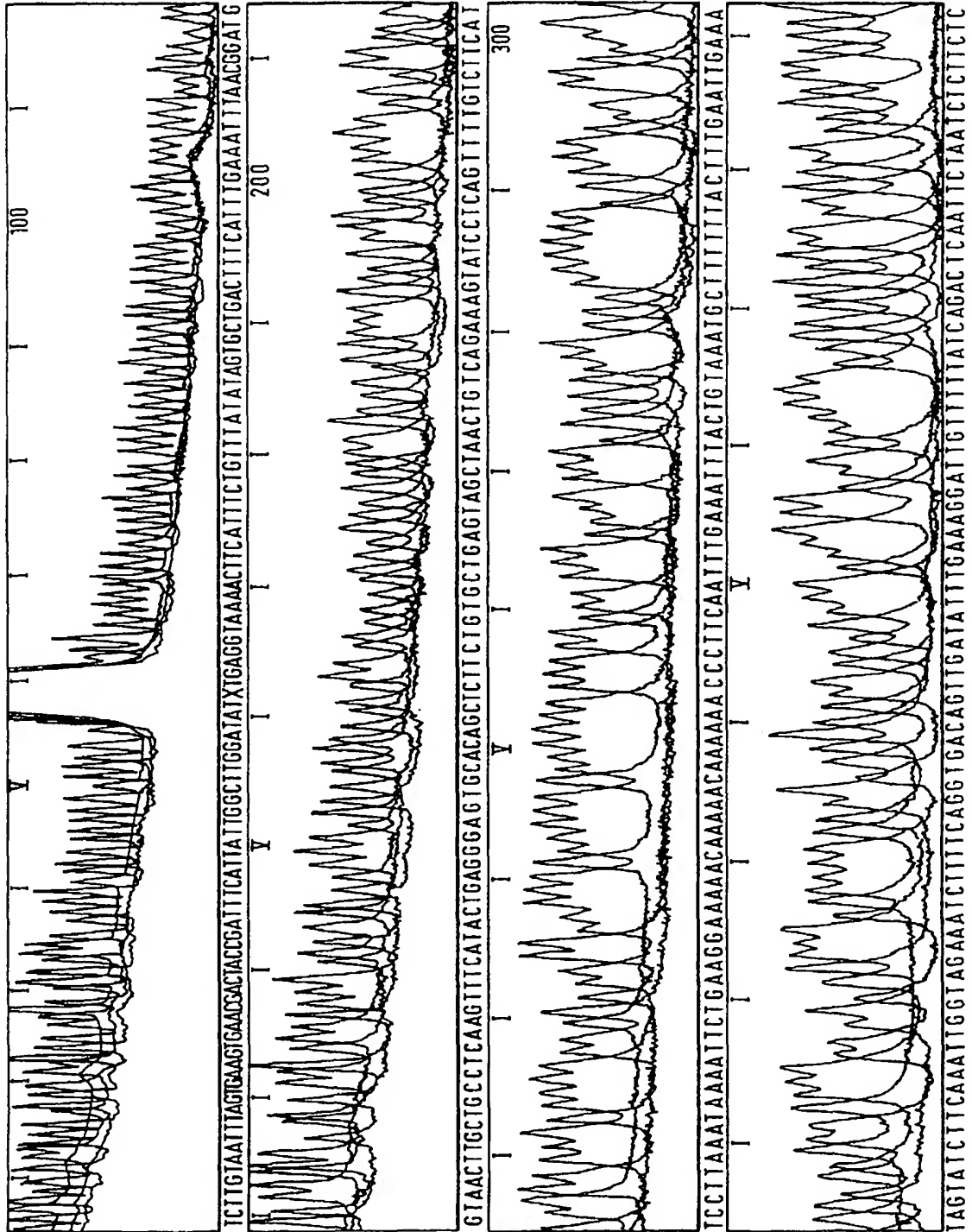


Fig. 3b

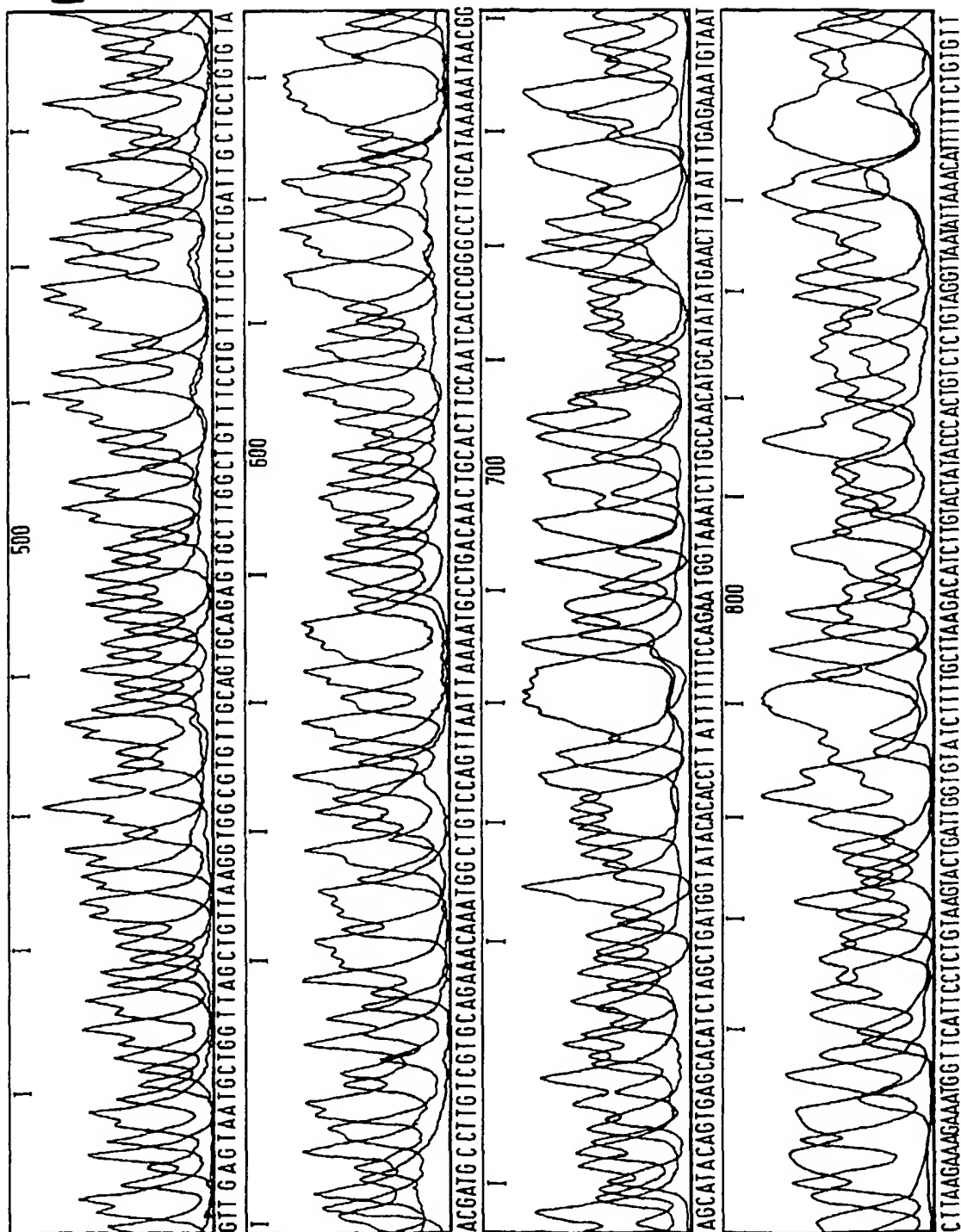
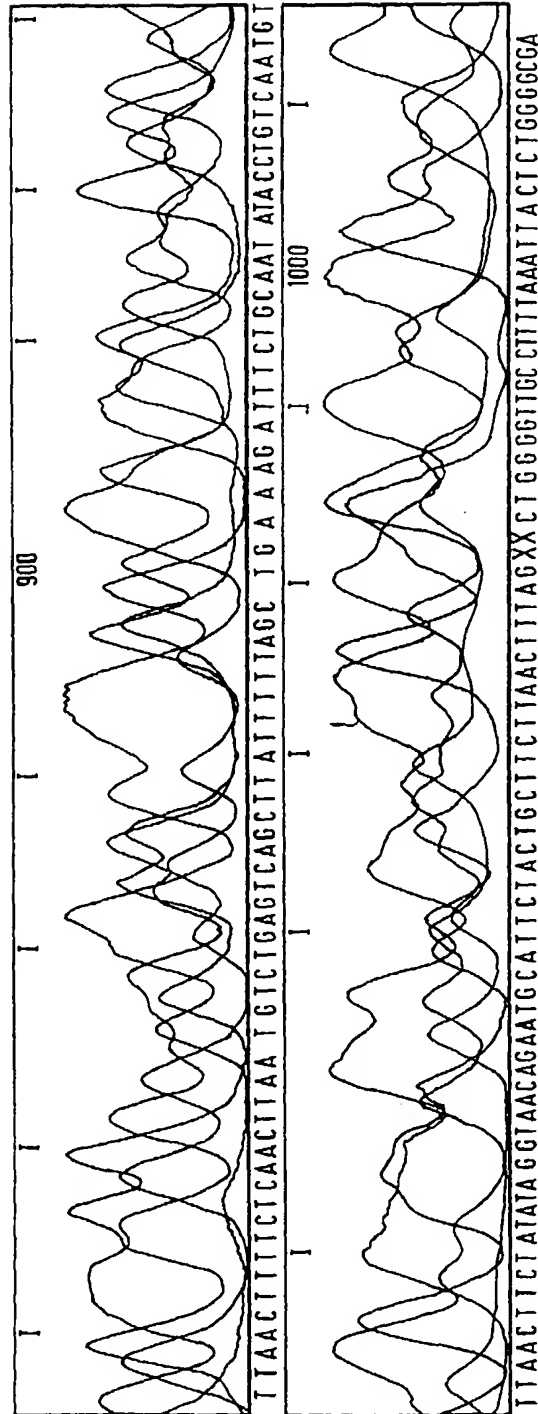


Fig. 3c



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,3 841 565 (EMBL) 28 June 1990 cited in the application see the whole document ---	1,6-13, 16-21 31-41
X	DE,A,3 839 397 (EMBL) 31 May 1990 cited in the application see the whole document ---	1-5, 8-14, 16-24 32-42
X	EP,A,0 309 969 (DU PONT DE NEMOURS & CO.) 5 April 1989 see example 13 ---	1,5
X	EP,A,0 371 437 (ORION-YHTYMA OY) 6 June 1990 see the whole document ---	1,14,15, 24
	--- -/--	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1992 (11.11.92)

Date of mailing of the international search report

14 December 1992 (14.12.92)

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01756

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 409 078 (BASF) 23 January 1991 see the whole document	1,25
X	WO,A,9 004 649 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 3 May 1990 see the whole document	1
A	WO,A,9 003 442 (CETUS CORP.) 5 April 1990 see claim 3	1,6,7

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 9201756
SA 62792

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/11/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3841565	28-06-90	US-A- 5124247	23-06-92
DE-A-3839397	31-05-90	None	
EP-A-0309969	05-04-89	US-A- 5102785 JP-A- 1137983	07-04-92 30-05-89
EP-A-0371437	06-06-90	AU-B- 623200 AU-A- 4574989 CA-A- 2004056 JP-A- 2219600	07-05-92 07-06-90 29-05-90 03-09-90
EP-A-0409078	23-01-91	DE-A- 3923895 JP-A- 3072899	24-01-91 28-03-91
WO-A-9004649	03-05-90	DE-A- 3930312 EP-A- 0439537 JP-T- 4501361	26-04-90 07-08-91 12-03-92
WO-A-9003442	05-04-90	US-A- 5075216 AU-A- 4300389 EP-A- 0437459 JP-T- 4501205	24-12-91 18-04-90 24-07-91 05-03-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/01756

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Kl. 5 C12Q1/68		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12Q	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	DE,A,3 841 565 (EMBL) 28. Juni 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,6-13, 16-21 31-41
X	DE,A,3 839 397 (EMBL) 31. Mai 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-5, 8-14, 16-24 32-42
X	EP,A,0 309 969 (DU PONT DE NEMOURS & CO.) 5. April 1989 siehe Beispiel 13 ---	1,5
X	EP,A,0 371 437 (ORION-YHTYMA OY) 6. Juni 1990 siehe das ganze Dokument ---	1,14,15, 24
-/--		
<p>⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
11. NOVEMBER 1992	14. 12. 92	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	MOLINA GALAN E.	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 409 078 (BASF) 23. Januar 1991 siehe das ganze Dokument ---	1,25
X	WO,A,9 004 649 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 3. Mai 1990 siehe das ganze Dokument ---	1
A	WO,A,9 003 442 (CETUS CORP.) 5. April 1990 siehe Anspruch 3 -----	1,6,7

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9201756
 SA 62792

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

11/11/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-3841565	28-06-90	US-A- 5124247	23-06-92
DE-A-3839397	31-05-90	Keine	
EP-A-0309969	05-04-89	US-A- 5102785 JP-A- 1137983	07-04-92 30-05-89
EP-A-0371437	06-06-90	AU-B- 623200 AU-A- 4574989 CA-A- 2004056 JP-A- 2219600	07-05-92 07-06-90 29-05-90 03-09-90
EP-A-0409078	23-01-91	DE-A- 3923895 JP-A- 3072899	24-01-91 28-03-91
WO-A-9004649	03-05-90	DE-A- 3930312 EP-A- 0439537 JP-T- 4501361	26-04-90 07-08-91 12-03-92
WO-A-9003442	05-04-90	US-A- 5075216 AU-A- 4300389 EP-A- 0437459 JP-T- 4501205	24-12-91 18-04-90 24-07-91 05-03-92

EPO FORM P0073